

环黄芪醇通过Nrf2/HO-1信号通路在t-BHP诱导的C2C12细胞损伤中的保护作用

刘利¹ 马蓓蓓¹ 李梦俊¹ 张晓荣¹ 高艳萍^{2*}

(¹山西医科大学研究生学院, 太原 030001; ²山西医科大学汾阳学院, 汾阳 032200)

摘要 该文旨在探讨环黄芪醇对叔丁基过氧化氢(t-BHP)诱导小鼠C2C12成肌细胞氧化应激损伤的保护作用及机制研究。用不同浓度的环黄芪醇和100 μmol/L t-BHP处理C2C12细胞; 采用CCK-8法检测细胞活力; EdU-488实验检测细胞增殖; DCFH-DA荧光探针法测定细胞的ROS水平; 生化法检测细胞中MDA、SOD水平; Western blot检测PAX7、MYOD、Keap1、Nrf2、HO-1蛋白表达量; 细胞免疫荧光检测Nrf2核转位情况。结果显示, 与t-BHP组相比, 环黄芪醇能提高C2C12细胞活力, 降低胞内ROS和MDA含量, 提高SOD活性; 环黄芪醇亦可促进细胞增殖、分化相关蛋白PAX7、MYOD的表达。环黄芪醇可通过抑制Keap1蛋白表达, 促进Nrf2与Keap1解耦联后的入核表达, 上调下游关键分子HO-1蛋白的表达。si-Nrf2处理能够抑制Nrf2/HO-1信号通路, 提高ROS的生成, 抑制环黄芪醇对t-BHP诱导的C2C12氧化损伤的拮抗作用。这提示环黄芪醇可在t-BHP诱导的C2C12细胞氧化损伤中发挥保护作用, 其机制可能与抑制Keap1的表达、促进Nrf2的核转位、上调HO-1的表达相关。

关键词 环黄芪醇; t-BHP; C2C12细胞; 氧化应激; Nrf2/HO-1

Cycloastragenol Prevents the Oxidative Damage Induced by t-BHP in C2C12 Cells through Nrf2/HO-1 Pathway

LIU Li¹, MA Beibei¹, LI Mengjun¹, ZHANG Xiaorong¹, GAO Yanping^{2*}

(¹Graduate School of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

²Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the protective effect and the mechanism of cycloastragenol on oxidative damage of C2C12 cells induced by t-BHP (tert-butyl hydroperoxide). C2C12 cells were treated with the different concentrations of cycloastragenol, and then with 100 μmol/L t-BHP. Cell viability was measured by CCK-8 assay. EDU-488 assay was used to detect cell proliferation. The intracellular ROS levels were measured by DCFH-DA. The levels of SOD and MDA were detected by biochemical method. The relative expression levels of PAX7, MYOD, Keap1, Nrf2 and HO-1 proteins were detected by Western blot analysis. Nuclear translocation of Nrf2 was characterized by immunofluorescence. Compared with the t-BHP group, cycloastragenol improved the viability of C2C12 cells, reduced the content of ROS and MDA, increased SOD activity. In addition, cycloastragenol promoted the expression of proliferation and differentiation-related proteins (PAX7 and MYOD). Cycloastragenol decreased the expression of Keap1, increased the nuclear expression of the Nrf2 uncoupled to

收稿日期: 2021-08-29

接受日期: 2021-09-29

山西省吕梁市重点研发项目(批准号: 2020SHFZ33)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13835801063, E-mail: gypbb@163.com

Received: August 29, 2021

Accepted: September 29, 2021

This work was supported by the Major Research and Development Project of Lüliang City in Shanxi Province (Grant No.2020SHFZ33)

*Corresponding author. Tel: +86-13835801063, E-mail:gypbb@163.com

Keap1, and sequentially up-regulated the levels of HO-1. si-Nrf2 inhibited Nrf2/HO-1 signaling pathway, elevated the production of ROS and thus inhibited the protective effects of cycloastragenol in t-BHP-treated C2C12 cells. These results suggested that cycloastragenol aginsted t-BHP-induced oxidative injury in C2C12 cells, and its mechanism was probably associated with the inhibition of Keap1 expression, the promotion of Nrf2 nuclear translocation, and the up-regulation of HO-1 expression.

Keywords cycloastragenol; t-BHP; C2C12 cells; oxidative stress; Nrf2/HO-1

骨骼肌是人体内数量最多的组织, 约占体重的40%, 其对于机体运动、姿势支持、呼吸和生热等重要功能必不可少, 但许多慢性疾病、消耗性疾病、增龄等都会使骨骼肌的再生能力缓慢下降^[1-2]。骨骼肌作为一种高耗氧、高能量需求组织, 也增加了线粒体活性氧升高的固有风险, 其修饰性活性氧生成和氧化损伤被认为是骨骼肌减少的重要介质^[3-4]。已有研究表明, 在衰老或慢性疾病中, 骨骼肌质量与谷胱甘肽减少和氧化应激(oxidative stress, OS)增加相伴随^[5]。因此, 降低骨骼肌活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, 抑制OS, 对治疗骨骼肌减少具有重要意义。研究表明, 黄芪多糖可抑制过氧化物诱导的C2C12成肌细胞自噬和凋亡, 促进成肌细胞的增殖; 亦可改善地塞米松诱导的肌肉萎缩^[6-7]。而环黄芪醇(cycloastragenol, CAG)是黄芪甲苷的苷元, 可通过黄芪甲苷制备得到, 与黄芪甲苷相比, 环黄芪醇的脂溶性更强, 更易通过细胞膜, 利于机体吸收^[8]。环黄芪醇可以提高端粒酶的活性, 从而延缓细胞衰老, 有良好的抗氧化作用^[9]。YU等^[10]近期研究表明, 环黄芪醇可通过减轻D-半乳糖诱导的大鼠衰老及普通老年大鼠骨骼中的骨微结构退化, 从而缓解与年龄增长有关的骨质流失, 提示其可作为老年性骨质疏松症的潜在治疗药物。但环黄芪醇能否对氧化应激状态下的C2C12细胞产生影响尚不清楚。本研究选用小鼠C2C12成肌细胞作为肌肉再生的体外模型, 拟探讨环黄芪醇对氧化应激引起的C2C12成肌细胞损伤的保护作用和分子机制, 以期为治疗骨骼肌减少提供相应的实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂

C2C12细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 叔丁基过氧化氢溶液购自美国Sigma公司; 环黄芪醇、活性氧(ROS)检测试剂盒、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、EDU-488检测试剂盒、

Lipofectamine 8000、Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; CCK-8试剂盒、DAPI染色液、二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; 核因子E2相关因子(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like epichlorohydrin-related protein-1, Keap1)、肌肉分化决定因子(myogenic differentiation gene, MyoD)单克隆抗体购自ABclonal公司; 血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)单克隆抗体购自Proteintech公司; 核转录因子7(paired box gene 7, Pax7)单克隆抗体购自Abcam公司; Nrf2干扰链和对照干扰链购于购自广州锐博生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 体外细胞培养及药物处理C2C12细胞 用含体积分数10%胎牛血清和1%青/链霉素双抗的DMEM培养基培养细胞, 用含体积分数2%马血清和1%青/链霉素双抗的DMEM培养基培养2~3天诱导细胞分化, 将对数生长期的C2C12细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板上, 进行如下分组。(1) 剂量组: Control组(不做任何处理)、t-BHP组(100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP)、环黄芪醇低剂量组(1 $\mu\text{mol/L}$ CAG+100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP)、环黄芪醇中剂量组(10 $\mu\text{mol/L}$ CAG+100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP)、环黄芪醇高剂量组(20 $\mu\text{mol/L}$ CAG+100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP); (2) Nrf2敲低组(t-BHP使用浓度为100 $\mu\text{mol/L}$, 环黄芪醇使用浓度为20 $\mu\text{mol/L}$): Control组(不做任何处理)、t-BHP组、t-BHP+si-NC组、t-BHP+si-Nrf2组、t-BHP+si-Nrf2+CAG组、t-BHP+CAG组。

1.2.2 细胞转染 将细胞接种在6孔板中培养, 待细胞融合至40%时, 根据Lipofectamine 8000转染试剂说明书, 将转染复合物加入6孔板中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温细胞培养箱中培养48 h, 更换新培养基进行后续干预。

1.2.3 CCK-8检测细胞活力 处于对数生长期的C2C12细胞,以每孔初始密度5 000个/100 μL 接种于96孔板,边缘孔用PBS覆盖,摇匀,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养24 h后,先用不同浓度(1、10、20 $\mu\text{mol/L}$)环黄芪醇处理24 h后,再加入100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP处理6 h,每孔加入10 μL CCK-8溶液37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,酶标仪检测450 nm处吸光度(D)值,分析细胞活力。

1.2.4 EdU-488检测细胞增殖 将6孔板中干预好的细胞加入37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的EdU工作液孵育2 h,弃工作液;每孔加1 mL固定液,室温固定15 min,弃固定液,用含3% BSA的PBS洗涤液洗5 min \times 3次;每孔加1 mL 0.3% Triton X-100,室温孵育15 min,弃Triton X-100,洗涤液洗5 min \times 3次;每孔加500 μL Click反应液,室温避光孵育30 min,弃Click反应液,洗涤液洗5 min \times 3次;每孔加1 mL Hoechst液,室温避光孵育10 min,弃Hoechst液,洗涤液洗5 min \times 3次;荧光显微镜采集图像。

1.2.5 细胞氧化应激检测 化学荧光法检测ROS水平。首先将C2C12细胞接种在12孔板上,进行分组干预后,弃去旧培养基,加入500 μL 终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的DCFH-DA溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,无血清培养基清洗3次去除未进入细胞内的DCFH-DA,使用荧光显微镜观察、拍照。

TBA法检测MDA水平。将收集好的各组细胞沉淀进行破碎,分别将标准品和待测样品按说明书加入到空白管、标准管、测定管、对照管,混匀,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴40 min,冷却,4 000 r/min离心10 min,取上清,于532 nm波长处测吸光度(D)值。

羟胺法检测SOD水平。将收集好的各组细胞沉淀,加PBS超声破碎,用BCA法测定蛋白浓度,按SOD检测试剂盒说明书将工作液和待测样本加入96孔板,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,酶标仪450 nm处检测吸光度(D)值。

1.2.6 Western blot检测蛋白水平 将收集好的各组细胞沉淀置于冰上,每个EP管加入70 μL 蛋白裂解液(细胞裂解液:PMSF=100:1)混匀并用超声破碎仪破碎细胞,冰上静置30 min,13 800 r/min离心15 min,吸取上清即为总蛋白。根据BCA法,检测蛋白浓度并调齐,10% SDS-PAGE电泳约2 h,转膜2 h,用体积分数为5%的脱脂牛奶室温封闭2 h,一抗(PAX7、MYOD、Keap1、Nrf2、HO-1抗体,稀释比例分别均为1:1 000; Histone H3抗体,稀释比例为1:500; GAPDH抗体,稀释比例为1:7 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用TBST洗膜15 min \times 3

次,室温二抗(稀释比例为1:5 000)孵育2 h, TBST洗膜15 min \times 3次,加入ECL化学发光液后用Bio-Rad成像仪曝光拍照, Image Lab软件分析结果。

1.2.7 细胞免疫荧光检测Nrf2的表达 将C2C12细胞以 1×10^4 个/孔接种于24孔板,次日加入药物进行干预,弃去培养基, PBS洗5 min \times 3次;用预冷的4%多聚甲醛固定细胞20 min,弃去固定液, PBS洗5 min \times 3次;用0.5% Triton X-100室温孵育细胞20 min,使细胞通透,弃通透液, PBS洗5 min \times 3次;1% BSA室温封闭1 h,弃封闭液;一抗(稀释比例为1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS洗5 min \times 3次;加FITC标记的荧光二抗(稀释比例为1:200)室温暗室孵育1 h, PBS洗5 min \times 3次;加入DAPI染液室温孵育10 min, PBS洗5 min \times 3次;荧光显微镜采集图像。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析,组间比较使用单因素方差分析。应用GraphPad Prism 8.0软件进行图表制作。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 环黄芪醇提高t-BHP诱导的C2C12细胞活力

环黄芪醇的化学结构如图1A所示。CCK-8检测细胞活力,与Control组相比t-BHP处理后C2C12的细胞活力显著降低,采用不同剂量环黄芪醇处理后,细胞活力显著升高,且与环黄芪醇浓度呈剂量依赖性(图1B)。

2.2 环黄芪醇促进C2C12细胞增殖

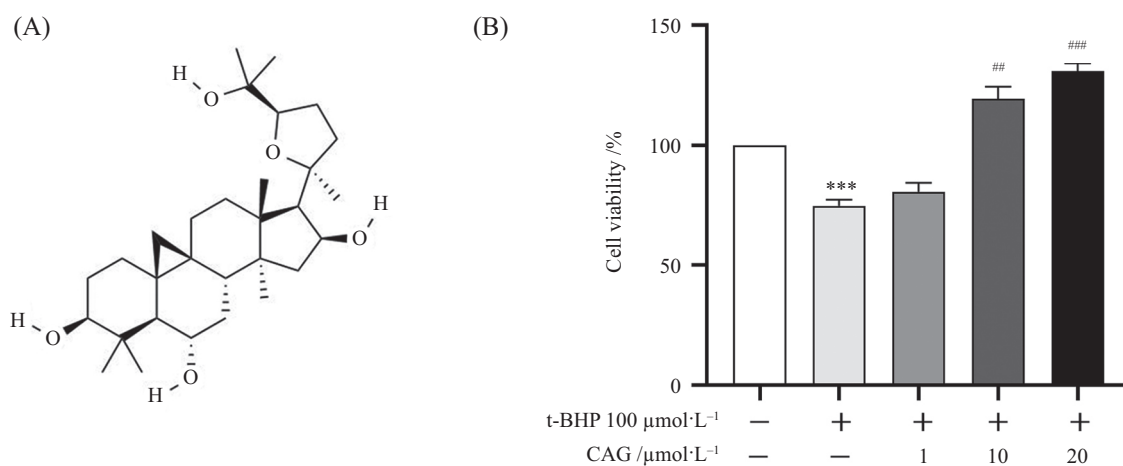
与Control组相比, t-BHP组绿色荧光细胞数显著减少, C2C12细胞增殖被抑制;与t-BHP组相比,不同剂量环黄芪醇处理后,绿色荧光细胞数均显著增加。表明一定浓度的环黄芪醇可促进C2C12细胞增殖。

2.3 环黄芪醇抑制t-BHP诱导的氧化应激

与Control组相比, t-BHP处理后,细胞中MDA(图3A)、ROS(图3C)含量显著增加($P<0.001$), SOD(图3B)活力下降($P<0.001$);与t-BHP组相比,环黄芪醇可显著下调t-BHP诱导的MDA、ROS产生($P<0.05$),并提高SOD活力($P<0.001$)。环黄芪醇抑制t-BHP诱导的C2C12细胞氧化应激。

2.4 环黄芪醇促进细胞增殖、分化相关蛋白的表达

Western blot检测增殖相关蛋白PAX7、分化相关蛋白MYOD的表达情况。结果(图4)所示, t-BHP组PAX7、MYOD蛋白表达量较Control组减少($P<0.01$);



A: 环黄芪醇化学结构图; B: CCK-8检测环黄芪醇联合t-BHP对C2C12细胞活力的影响。*** $P<0.001$, 与对照组相比; # $P<0.01$, ### $P<0.001$, 与t-BHP组相比。

A: chemical structure diagram of cycloastragenol; B: the effect of cycloastragenol combined with T-BHP on the viability of C2C12 cells was detected by CCK-8 assay. *** $P<0.001$ compared with control group; # $P<0.01$, ### $P<0.001$ compared with t-BHP group.

图1 CCK-8检测C2C12细胞活力

Fig.1 The viability of C2C12 cells was detected by CCK-8 assay

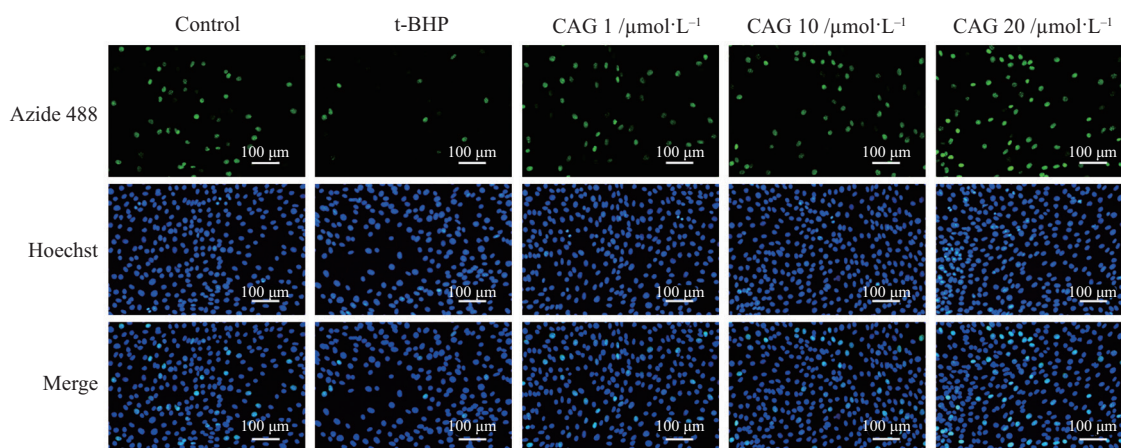


图2 EdU-488实验检测各组细胞增殖情况

Fig.2 Cell proliferation of each group was detected by EdU-488 experiment

与t-BHP组相比, 不同剂量环黄芪醇处理可显著提高PAX7、MYOD蛋白表达水平($P<0.05$)。

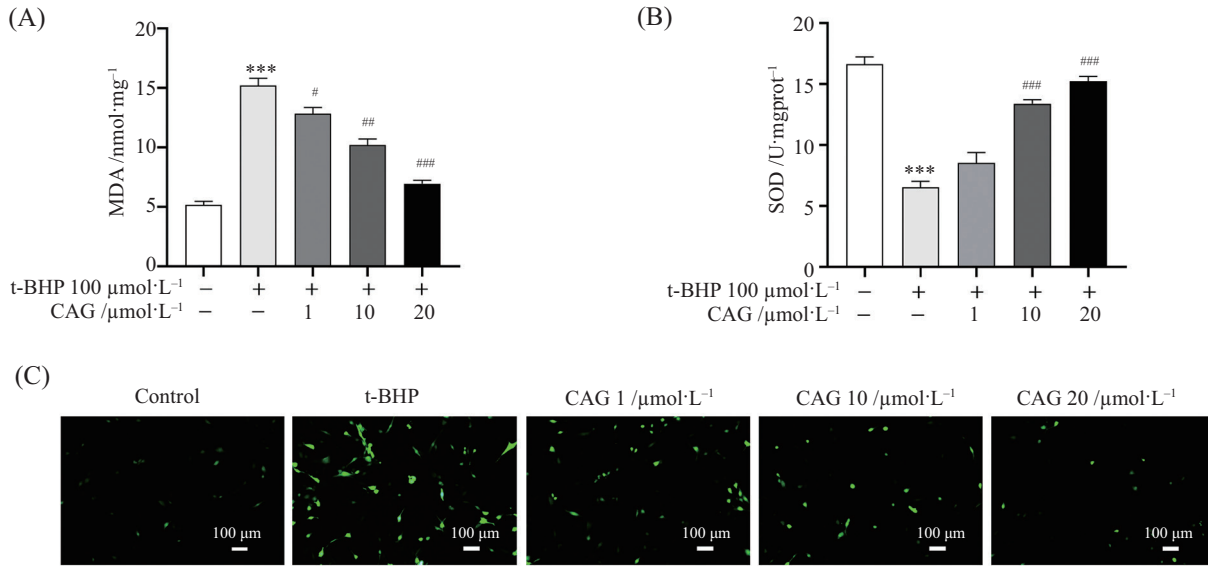
2.5 环黄芪醇通过激活Nrf2/HO-1通路抑制氧化应激损伤

Western blot检测Nrf2/HO-1通路相关蛋白表达水平, 结果(图5A)显示, 与Control组相比, t-BHP刺激可使Nrf2蛋白及下游HO-1蛋白高表达($P<0.01$); 与t-BHP组相比, 环黄芪醇处理后Keap1、Cyto-Nrf2蛋白表达降低, Nuclear-Nrf2、HO-1蛋白表达升高($P<0.05$)。为了进一步了解Nrf2核转移情况, 采用细胞免疫荧光进行观察, 明显观察到环黄芪醇可增加Nrf2核内蛋白表达量(图5B)。这表明, 环黄芪醇可通过抑制Keap1

蛋白表达, 进而促进Nrf2由胞质向核内迁移, 进入核内的Nrf2将促进下游靶基因HO-1高表达。

2.6 敲低Nrf2逆转了环黄芪醇对细胞氧化损伤的保护

本实验使用si-RNA敲低Nrf2, 进一步观察环黄芪醇对氧化应激状态下C2C12细胞的保护作用。Western blot结果(图6A)显示, 第3条干扰链009干扰效果最佳($P<0.001$)。使用第3条干扰链009以及阴性对照si-NC转染至C2C12细胞进行后续实验。Western blot结果(图6B)显示, t-BHP+si-NC组与t-BHP组对比差异无统计学意义。与t-BHP+CAG相比, t-BHP+si-Nrf2+CAG组细胞内ROS含量增加(图6C), HO-1蛋白水

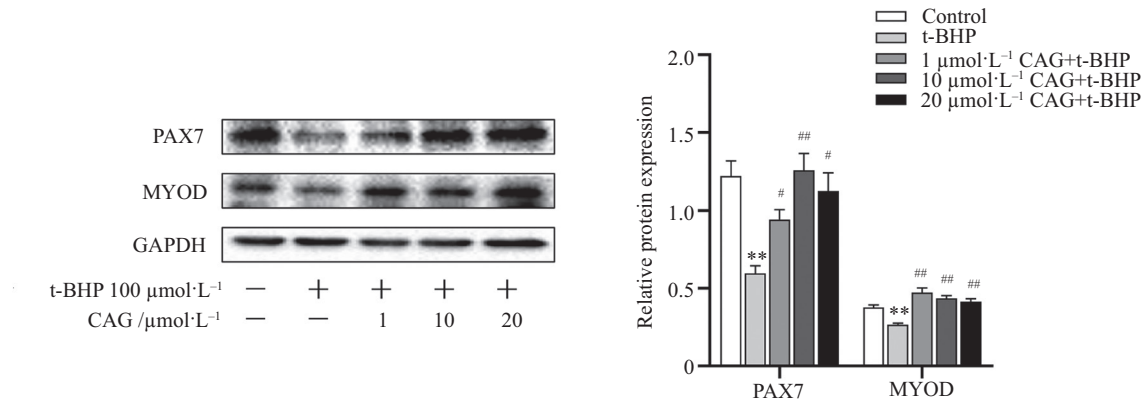


A: 各组细胞中MDA含量; B: 各组细胞中SOD含量; C: 各组细胞ROS表达情况。*** $P<0.001$, 与对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, 与t-BHP组相比。

A: the content of MDA in each group; B: the content of SOD in each group; C: the expression of ROS in each group. *** $P<0.001$ compared with control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ compared with t-BHP group.

图3 环黄芪醇对t-BHP诱导的C2C12细胞氧化应激的影响

Fig.3 Effects of cycloastragenol on oxidative stress induced by t-BHP in C2C12 cells



** $P<0.01$, 与对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与t-BHP组相比。

** $P<0.01$ compared with control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with t-BHP group.

图4 环黄芪醇影响C2C12细胞增殖、分化相关蛋白的表达

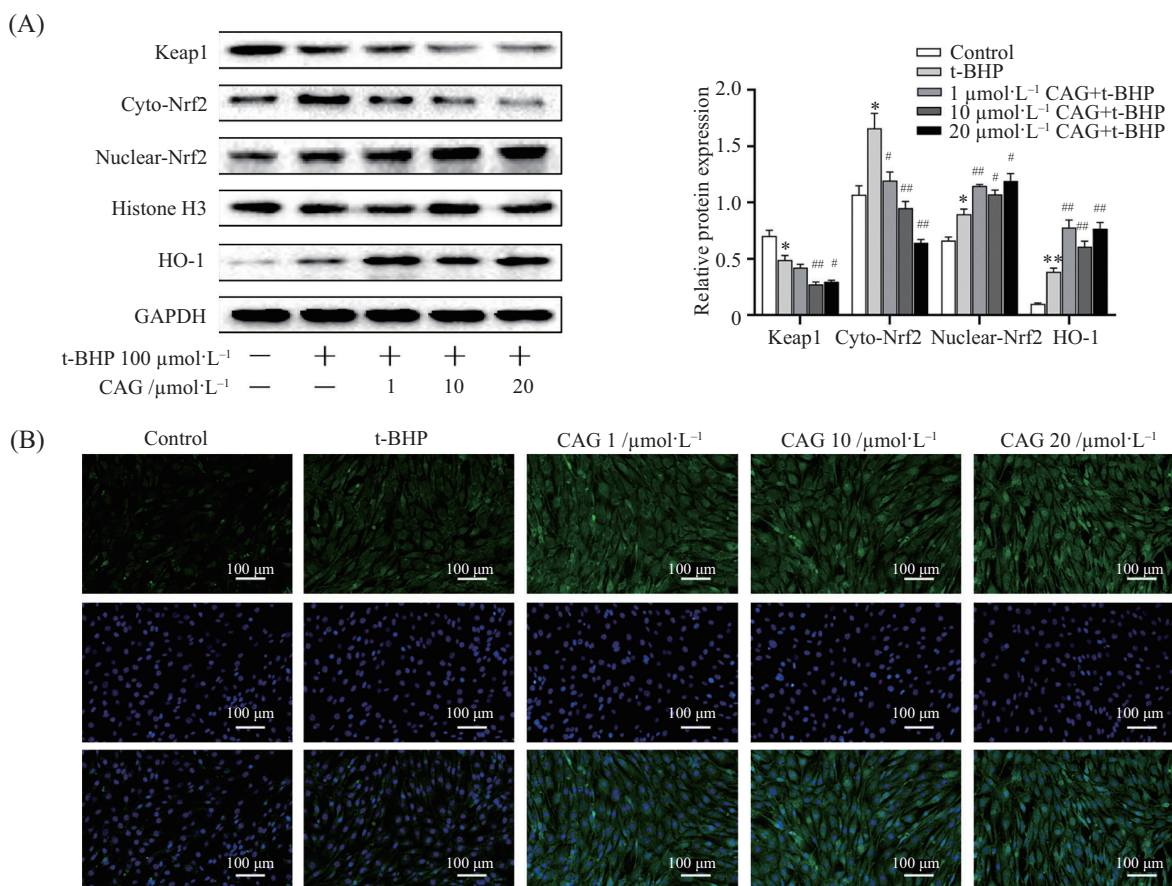
Fig.4 Cycloastragenol affected the expression of proteins related to proliferation and differentiation in C2C12 cells

平下调(图6B)($P<0.001$)。结果表明, 敲低*Nrf2*逆转了环黄芪醇对C2C12细胞氧化损伤的保护作用。

3 讨论

小鼠C2C12成肌细胞, 来源于骨骼肌卫星细胞系, 可为肌肉生长、修复和再生提供肌核。当骨骼肌受到某些刺激时, 骨骼肌卫星细胞被激活, 促使其广泛增殖, 并促进骨骼肌卫星细胞分化为成肌细胞, PAX7是C2C12成肌细胞增殖所必需的蛋白,

MYOD、MYOG是C2C12成肌细胞分化所必需的蛋白^[11]。C2C12细胞在人类骨骼肌细胞中具有代表性, 已被广泛应用于体外作为了解肌肉代谢性疾病进展的检测模型^[12]。因此, 本研究采用t-BHP诱导C2C12细胞建立氧化应激损伤模型。经t-BHP诱导后C2C12细胞中可产生大量的ROS和脂质化终产物MDA, 从而使对抗氧自由基的SOD表达量减少。高水平的ROS抑制C2C12细胞增殖分化, 表现为增殖相关蛋白PAX7、分化相关蛋白MYOD表达水平下



A: Western blot检测各组Keap1、Nrf2、HO-1蛋白表达水平; B: Nrf2蛋白的细胞免疫荧光定位。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与t-BHP组相比。

A: the protein expression levels of Keap1, Nrf2 and HO-1 in each group were detected by Western blot; B: cellular immunofluorescence localization of Nrf2 protein. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with t-BHP group.

图5 Western blot和免疫荧光法检测蛋白表达

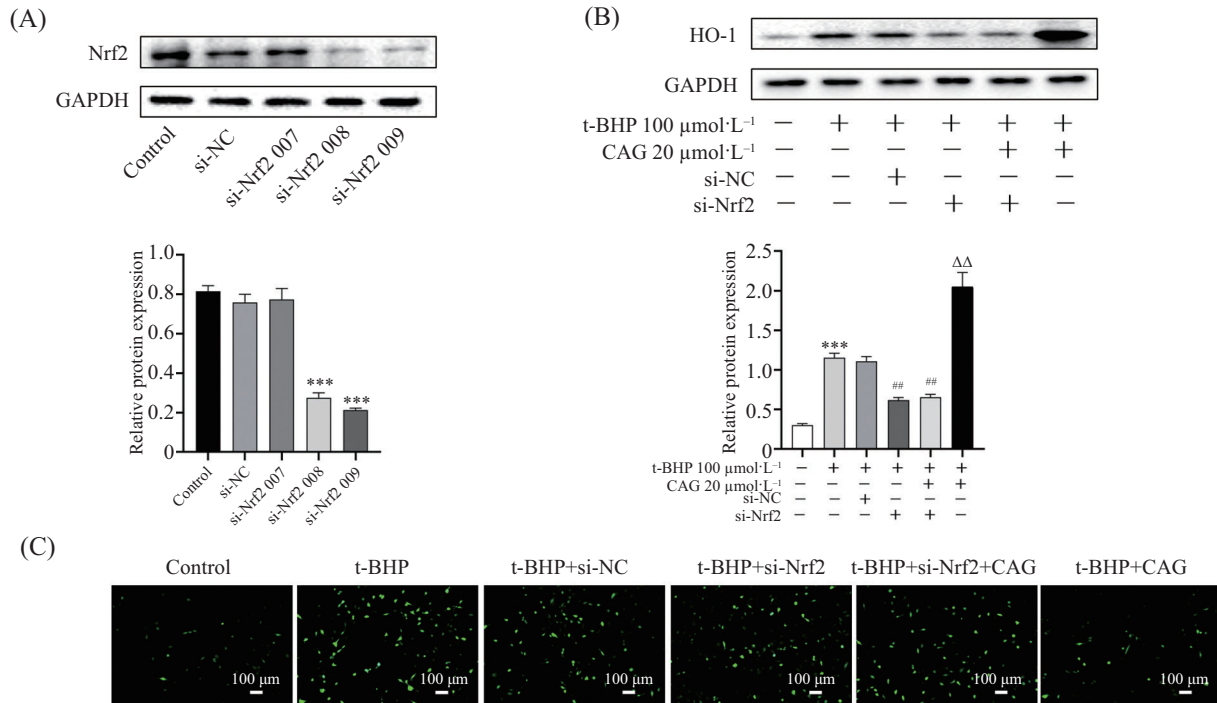
Fig.5 Expressions of proteins were tested by Western blot and immunofluorescence assay

降。结果表明, t-BHP处理可诱导C2C12细胞氧化损伤, 使成肌细胞增殖分化能力降低。

环黄芪醇是一种四环三萜类化合物, 是黄芪药理作用的重要成分, 具有增强机体清除氧自由基能力、抑制过氧化反应等功效。既往研究发现, 环黄芪醇通过降低缺血脑中促凋亡Bax蛋白与抗凋亡Bcl-2蛋白的比例来抑制缺血后p53依赖性细胞凋亡^[13]。ZHAO等^[14]发现, 环黄芪醇可通过调节AMPK活性抑制TXNIP/NLRP3炎症性激活也可抑制活性氧引起的内质网应激, 对调节内皮细胞稳态具有重要作用。环黄芪醇在氧化应激导致的C2C12细胞损伤中发挥保护作用, 其作用机制尚不清楚。本实验采用不同浓度的环黄芪醇干预C2C12细胞后, 发现环黄芪醇能够缓解t-BHP诱导的C2C12氧化损伤, 表现为环黄芪醇可以降低t-BHP诱导胞内ROS、MDA表达水平增

高, 增强SOD活性, Western blot结果显示, 环黄芪醇促进C2C12细胞PAX7和MYOD蛋白的表达, 提示环黄芪醇在成肌细胞氧化损伤中具有保护作用。

正常机体内自由基的产生与降解处于动态平衡中, 而衰老状态的机体伴随着过量活性氧自由基的产生。Nrf2/HO-1信号通路是细胞防御氧化应激损伤的重要机制之一^[15]。Nrf2是机体氧化应激反应的调节中枢, 可以维持细胞的氧化还原稳态, 改善机体氧化应激状态^[16]。Nrf2的激活在预防细胞和组织氧化应激引起的损伤中发挥重要作用^[17]。在正常的氧化还原条件下, Nrf2在细胞质中与Keap1偶联, 使Nrf2处于无活性状态且易通过泛素-蛋白酶体途径被降解, 当细胞受到氧化应激刺激后, Nrf2与Keap1解偶联, 促使Nrf2转移入核内, 与小Maf蛋白形成Nrf2-Maf复合物, 识别并结合ARE启动子, 最终启动



A: Western blot筛选敲低Nrf2效果最佳的干扰链; B: Western blot检测敲低Nrf2后环黄芪醇对C2C12细胞中HO-1含量的影响; C: 敲低Nrf2后环黄芪醇对C2C12细胞中ROS生成的影响。*** $P < 0.001$, 与对照组相比; ## $P < 0.01$, 与t-BHP+si-NC组相比; $\Delta\Delta P < 0.01$, 与t-BHP+si-Nrf2+CAG组相比。A: Western blot selected the interference chain with the best effect of knocking down Nrf2; B: the levels of HO-1 in C2C12 cells treated with cycloastragenol were detected by Western blot after Nrf2 knockdown; C: the effects of cycloastragenol on ROS production in C2C12 cells after Nrf2 knockdown. *** $P < 0.001$ compared with control group; ## $P < 0.01$ compared with t-BHP+si-NC group; $\Delta\Delta P < 0.01$ compared with t-BHP+si-Nrf2+CAG group.

图6 敲低Nrf2后检测环黄芪醇对C2C12细胞HO-1蛋白表达和ROS生成的影响

Fig.6 HO-1 protein expression and ROS production levels treated with cycloastragenol in C2C12 cells were tested after Nrf2 knockdown

下游多种抗氧化蛋白酶基因(如HO-1)的表达,发挥抗氧化损伤作用^[18]。既往的研究表明, Nrf2的缺乏及年龄的增加,可导致总ROS和线粒体ROS水平均显著升高^[19]。抑制Nrf2/ARE通路可破坏氧化还原平衡,促进肌细胞凋亡,加速肌细胞降解,导致骨骼肌减少^[20]。与年龄相关的Nrf2功能缺失会导致氧化应激,并延迟卫星细胞激活和骨骼肌再生^[21]。本实验进一步探讨了环黄芪醇在t-BHP诱导的C2C12细胞模型中的作用机制。Western blot检测发现, t-BHP处理后,可能由于C2C12细胞内产生大量ROS,使得Nrf2应激性增高,促使下游靶基因HO-1的表达,一定程度上起到自身防御保护的作用。经不同浓度的环黄芪醇预处理后, Western blot检测结果显示Keap1和胞内Nrf2蛋白的表达水平降低,而Nrf2的核内表达量及下游HO-1蛋白表达水平却升高。这表明,环黄芪醇可在一定程度上抑制Keap1蛋白的表达,使Nrf2从Keap1/Nrf2复合物中解离,转位进入细胞核并激活下游抗氧化蛋白发挥抗氧化效应。本研究使

用si-RNA敲低Nrf2,进一步观察环黄芪醇对氧化应激状态下C2C12细胞的保护作用,发现敲低Nrf2后,可显著抑制环黄芪醇诱导的HO-1表达,细胞中ROS含量增加,抑制环黄芪醇对t-BHP诱导C2C12细胞氧化损伤的保护作用。这些结果支持环黄芪醇是通过激活Nrf2,从而诱导HO-1蛋白高表达的。

综上,本研究发现环黄芪醇能够通过激活Nrf2/HO-1信号通路降低C2C12细胞氧化损伤,促进C2C12细胞增殖分化能力,为骨骼肌减少提供新的治疗思路。

参考文献 (References)

- [1] DUMONT N A, BENTZINGER C F, Sincennes M C, et al. Satellite cells and skeletal muscle regeneration [J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(3): 1027-59.
- [2] MUELLER A L, BLOCH R J. Skeletal muscle cell transplantation: models and methods [J]. *Muscle Res Cell Motil*, 2020, 41(4): 297-311.
- [3] RAJASEKARAN N S, SHELAR S B, JONES D P, et al. Reductive stress impairs myogenic differentiation [J]. *Redox*

- Biol, 2020, 34: 101492.
- [4] ROM O, REZNICK A Z. The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 98: 218-30.
- [5] HE L, HE T, FARRAR S, et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(2): 532-53.
- [6] YIN Y, LU L, WANG D, et al. Astragalus polysaccharide inhibits autophagy and apoptosis from peroxide-induced injury in C2C12 myoblasts [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 73(2): 433-9.
- [7] LU L, WANG D T, SHI Y, et al. Astragalus polysaccharide improves muscle atrophy from dexamethasone-and peroxide-induced injury *in vitro* [J]. Biol Macromol, 2013, 61: 7-16.
- [8] 李曼, 王志菲. 环黄芪醇的药理作用研究进展[J]. 中医学报(LI M, WANG Z F. Research progress in the pharmacological action of cycloastragalol [J]. Acta Chinese Medicine), 2020, 35(5): 983-9.
- [9] LIU J, GAO D, DAN J, et al. The protective effect of cycloastragenol on aging mouse circadian rhythmic disorder induced by D-galactose [J]. Cell Biochem, 2019, 120(10): 16408-15.
- [10] YU Y, WU J, LI J, et al. Cycloastragenol prevents age-related bone loss: evidence in D-galactose-treated and aged rats [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110304.
- [11] MATSUBARA T, URATA M, NAKAJIMA T, et al. Geranylgeraniol-induced myogenic differentiation of C2C12 cells [J]. In Vivo, 2018, 32(6): 1427-31.
- [12] WONG C Y, AL-SALAMI H, DASS C R. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage [J]. Pharm Pharmacol, 2020, 72(12): 1667-93.
- [13] LI M, LI S C, DOU B K, et al. Cycloastragenol upregulates SIRT1 expression, attenuates apoptosis and suppresses neuroinflammation after brain ischemia [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(8): 1025-32.
- [14] ZHAO Y, LI Q, ZHAO W, et al. Astragaloside IV and cycloastragenol are equally effective in inhibition of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in the endothelium [J]. Ethnopharmacol, 2015, 169: 210-8.
- [15] HAJRA S, PATRA A R, BASU A, et al. Prevention of doxorubicin (DOX)-induced genotoxicity and cardio toxicity: effect of plant derived small molecule indole-3-carbinol (I3C) on oxidative stress and inflammation [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 228-243.
- [16] ABED D A, GOLDSTEIN M, ALBANYAN H, et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(4): 285-99.
- [17] LIU Q, GAO Y, CI X. Role of Nrf2 and its activators in respiratory diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 7090534.
- [18] BRYAN H K, OLAYANJU A, GOLDRING C E, et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation [J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(6): 705-17.
- [19] HUANG D D, YAN X L, FAN S D, et al. Nrf2 deficiency promotes the increasing trend of autophagy during aging in skeletal muscle: a potential mechanism for the development of sarcopenia [J]. Aging, 2020, 12(7): 5977-91.
- [20] NARASIMHAN M, HONG J, ATIENO N, et al. Nrf2 deficiency promotes apoptosis and impairs PAX7/MyoD expression in aging skeletal muscle cells [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 71: 402-14.
- [21] SHELAR S B, NARASIMHAN M, SHANMUGAM G, et al. Disruption of nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2 antioxidant signaling: a mechanism for impaired activation of stem cells and delayed regeneration of skeletal muscle [J]. FASEB J, 2016, 30(5): 1865-79.